

大黄素对豚鼠结肠带平滑肌细胞钾通道活性的影响*

李俊英 杨文修 胡文卫 王 津 金正根 王新宇 许文胜

(南开大学物理系生物物理教研室, 天津 300071)

摘要 用检测平滑肌细胞电活动和张力技术,研究了大黄素对豚鼠结肠带平滑肌细胞电和收缩活动的影响并与 cromakalim, glybenclamide, 四乙胺及 BaCl₂ 的作用进行比较。结果表明,大黄素加强平滑肌细胞电和收缩活动,作用效果与剂量有关;大黄素与 cromakalim 的作用相互抑制。其促进平滑肌细胞电和收缩活动的作用与 glybenclamide 相似,而与四乙胺和 BaCl₂ 有明显区别。提示大黄素的作用机制与抑制细胞膜 K_{ATP} 等钾通道的活性相关。

关键词 大黄素;豚鼠结肠带;平滑肌细胞;钾通道阻断剂;K_{ATP}通道开放剂

豚鼠结肠带由纵行肌细胞组成,以大幅值的“分节律”位相性收缩为主要运动形式^[1]。中药大黄(Rhubarb)广泛用于治疗各种急腹症,通过增强肠道蠕动实现泻下作用^[2]。大黄素(emodin)是大黄有效成分蒽醌类衍生物之一。我们已报道^[3,4],豚鼠结肠带细胞膜电位的振荡上叠加峰电位的集簇发放与其分节律收缩相对应。大黄素可促进细胞膜去极化,缩短膜电位振荡周期,增加峰电位发放频率,从而显著增加分节律收缩的幅值指数。同时,大黄素对低K⁺和低葡萄糖溶液中标本收缩活动的减弱有促使其向正常恢复的作用。在肠道平滑肌细胞膜有K_V, K_{Ca}等多种钾通道,近年来又发现在多种细胞(包括平滑肌细胞)中存在ATP敏感的K⁺通道(ATP sensitive K⁺ channel, K_{ATP})^[5~7],但关于胃肠平滑肌细胞中K_{ATP}通道的作用甚少报道。我们以前的研究表明,大黄素的作用与调节细胞内能量代谢水平和降低膜对K⁺的通透性有关。为此,本研究在证实K通道特异性开放剂和抑制剂对结肠带平滑肌细胞电活动和收缩活动影响的基础上,比较了大黄素与不同K⁺通道阻断剂作用

的特征。探讨大黄素作用与K_{ATP}通道活性的关系,为药物的应用及深入了解其作用机理提供依据。

材 料 和 方 法

药品 大黄素(emodin), cromakalim (Cro), glybenclamide(Gly)购自Sigma公司,四乙胺(TEA)购自Merck公司。

标本制备 健康豚鼠60只,体重315±23g,♀♂不限。击头部至昏后,剖腹露出结肠,按金正根等^[8]的方法制备固定于有机玻璃框上的结肠带标本,然后在解剖镜下剥离掉残留的神经。标本长10mm,固定于浴槽中,可自由收缩的一端用丝线与肌张力传感器相连。

实验设计 用改良Krebs液(pH 7.2)灌流标本^[8],充以95% O₂和5% CO₂的混合气,灌流速度3 ml·min⁻¹,温度37±0.5℃。在标本出现规律的分节律收缩并稳定30 min后,记录正常状态下的电和收缩活动指标。然后分别以含有不同药物的Krebs液灌流,记录药物对电和收缩活动的影响。

电活动和收缩活动测量 用NP-3卧式微电极拉制器拉制微电极,充以3 mol·L⁻¹ KCl,

本文于1997年6月23日收到。

*国家自然科学基金资助课题, No 39400173

阻抗 30~60 MΩ。用 MO-102 型液压微推进器将微电极插入标本表层细胞内,引出单细胞自发电活动信号,信号经 JWF-2A 微电极放大器放大后,输入记忆示波器观测。检测的电活动指标有膜静息电位(RP),膜电位振荡周期(POP),峰电位频率(SPF)。

收缩活动的测量采用 JH-2A 型张力传感器作为机械-电转换器,输出的信号在 LM-14 自动平衡记录仪上绘出。检测指标有收缩幅值(CH)、周期(CP)、幅值指数(CHI,单位时间内收缩幅值的总和)。

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行成组 *t* 检验。

结 果

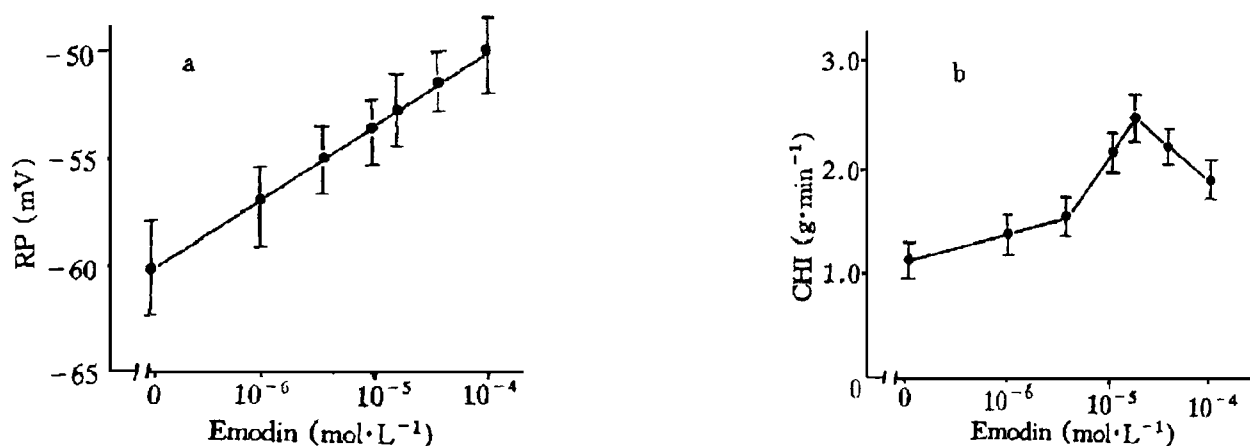


Fig 1 The relationship between emodin concentration and the resting potential(RP)(a) and the index of contraction height(CHI)(b) of the smooth muscle cells in guinea pig taenia coli.

2 Cromakalim(Cro)和 glybenclamide(Gly)对豚鼠结肠带细胞电和收缩活动的影响

对有正常电和收缩活动的标本,加入 K_{ATP} 通道特异性开放剂 Cro 使 RP 超极化,电和收缩活动被抑制。Cro $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 RP 由 $-59.2 \pm 4.1 \text{ mV}$ 降低为 $-68.1 \pm 5.1 \text{ mV}$, POP(CP)延长,SPF 下降,相应地标本收缩活动指标 CH,CHI 明显减小($P < 0.05$, $n = 11$)。在此条件下再加入 K_{ATP} 通道阻断剂 Gly($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),15 min 后,RP 由超极化状态恢复正常值,电和收缩活动各项指标也恢复正常值。将 Gly 浓度增加至 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,RP 稍微去极

1 大黄素对豚鼠结肠带细胞电活动和分节律收缩作用的量-效关系

用正常 Krebs 液灌流标本,检测其电和收缩活动指标。然后分别加入大黄素 $1, 5, 10, 20, 50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,随着药物浓度的增加,RP 呈线性升高(图 1a),当浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,RP 由 $-60.8 \pm 2.4 \text{ mV}$ 升高为 $-55.6 \pm 3.7 \text{ mV}$ ($P < 0.05$, $n = 10$)。POP(CP)随浓度增加呈线性缩短,CH 呈线性下降。而作为收缩活动综合指标的 CHI,随着浓度增加呈钟形曲线(图 1b)。当浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CHI 达到峰值 $2.3 \pm 0.2 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ 之后随浓度增加反趋下降。结果表明,大黄素对收缩活动有双向调节作用。

化($-57.8 \pm 3.7 \text{ mV}$),其它指标也略有增加,但与对照比较无显著性差异($P > 0.05$)。表明药物通过调节 K_{ATP} 通道的活性,使 RP 超极化或去极化,进而抑制或加强了细胞电和收缩活动。

3 Ba^{2+} 对豚鼠结肠带细胞电和收缩活动的影响

对正常电和收缩活动的标本,加入 BaCl_2 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,RP 由 $-61.7 \pm 3.7 \text{ mV}$ 升高为 $-54.8 \pm 4.4 \text{ mV}$ ($P < 0.05$, $n = 7$),同时 POP 缩短,SPF 略有增加。标本仍保持分节律收缩状态,CHI 增加。但 BaCl_2 浓度增加到 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

时,RP 显著去极化到 -39.6 ± 4.2 mV ($P < 0.01$, $n = 7$),在持续去极化状态下 POP 消失,标本的张力水平迅速升高至 2.2 ± 0.5 g,由分节律收缩转变为高张力水平的强直状态。

4 四乙胺(TEA)对豚鼠结肠带细胞电和收缩活动的影响

对于正常电和收缩活动的标本,TEA 0.5 mmol·L⁻¹使 RP 由 -59.3 ± 3.2 mV 去极化为 -52.1 ± 5.4 mV ($P < 0.05$, $n = 8$),SPF 增加。相应地收缩活动的 CH, CHI 升高,标本仍保持大幅值的分节律收缩状态。高剂量的 TEA(10 mmol·L⁻¹)使 RP 显著升高为 -37.8 ± 3.6 mV ($P < 0.01$, $n = 8$),POP 消失,标本

的张力水平迅速升高,呈高张力水平的强直收缩状态。

5 Cromakalim(Cro)对大黄素、Ba²⁺和 TEA 作用的影响

在正常溶液中先加入 Cro 10 μmol·L⁻¹,RP 超极化,电和收缩活动各项指标受到抑制,再加入大黄素 20 μmol·L⁻¹,标本在给药后 30 min,RP 恢复为稍超极化状态(图 2),但与正常值无显著性差异($P > 0.05$)。若在正常溶液中先加入大黄素 20 μmol·L⁻¹,电和收缩活动显著加强。再加入不同浓度的 Cro,大黄素的药物作用被抑制,抑制程度与 Cro 的剂量有关(表 1)。

Tab 1 Cromakalim(Cro) suppresses the enhancing effects of emodin(20 μmol·L⁻¹) on the electrical and contractive activities of smooth muscle cells in guinea pig taenia coli

Group (μmol·L ⁻¹)	n	Electrical activities			Contractive activities	
		RP(mV)	SPF(次·s ⁻¹)	POP(CP)min	CH(g)	CHI(g·min ⁻¹)
Control	10	-60.3 ± 3.5	1.23 ± 0.25	2.4 ± 0.3	2.8 ± 0.4	1.1 ± 0.2
Emodin	10	$-53.2 \pm 5.1^{**}$	$1.81 \pm 0.4^{**}$	$0.9 \pm 0.3^{***}$	$2.4 \pm 0.3^*$	$2.3 \pm 0.2^{**}$
Emodin + Cro (1)	9	$-55.2 \pm 3.2^\Delta$	$1.82 \pm 0.4^\Delta$	$0.9 \pm 0.2^\Delta$	$2.1 \pm 0.4^\Delta$	$2.2 \pm 0.3^\Delta$
Emodin + Cro (10)	10	$-64.1 \pm 3.2^{\Delta\Delta}$	$1.0 \pm 0.3^{\Delta\Delta}$	$3.4 \pm 0.7^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.5 \pm 0.3^{\Delta\Delta}$	$0.5 \pm 0.1^{\Delta\Delta}$
Emodin + Cro (50)	9	$-70.1 \pm 6.1^{\Delta\Delta\Delta}$	-	-	-	-

$\bar{x} \pm s$. RP: resting potential; SPF: frequency of spike potential; POP: period of oscillatory potential; CH: contraction height; CHI: index of contraction height; CP: contraction period. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control; $^\Delta P > 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.01$ vs emodin.

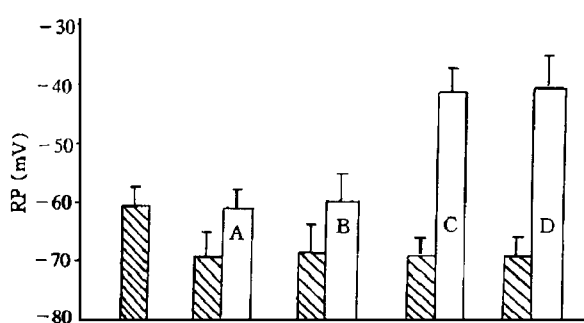


Fig 2 The effects of emodin, glybenclamide (Gly), Ba²⁺, TEA and cromakalim (Cro) on the resting potential(RP) of smooth muscle cells in guinea pig taenia coli and the relationship among them. Drugs and concentration: Cro(10 μmol·L⁻¹); A. Cro + Emodin(20 μmol·L⁻¹); B. Cro + Gly(20 μmol·L⁻¹); C. Cro + Ba²⁺(5 mmol·L⁻¹); D. Cro + TEA(10 mmol·L⁻¹). Control; □ Cromakalim(Cro).

当 Cro 10 μmol·L⁻¹使标本电和收缩活动抑制时,再加入 BaCl₂ 5 mmol·L⁻¹,RP 由超极化 -67.4 ± 2.9 mV 转变为持续去极化状态 -40.6 ± 3.1 mV ($P < 0.01$, $n = 9$)(图 2)。张力水平迅速升高,收缩活动由抑制状态转变为高张力水平的强直收缩状态。

TEA 对 Cro 药物作用的影响与 Ba²⁺相似,加入 TEA 10 mmol·L⁻¹后,RP 由超极化 -69.2 ± 4.1 mV 迅速升高为显著去极化状态 -40.2 ± 5.3 mV ($P < 0.01$, $n = 7$)(图 2)。相应地标本也呈现高张力水平的强直收缩状态。

讨 论

一些文献报道^[9,10]指出平滑肌细胞膜电

位振荡的起搏基础是膜对 K^+ 电导的周期性抑制。本实验用 K_{ATP} 通道的开放剂和抑制剂对豚鼠结肠带平滑肌细胞的研究结果表明, 该类细胞的 K_{ATP} 通道活性的变化对细胞膜电位振荡和分节律收缩的发生有重要作用。

文献报道, Ba^{2+} , TEA 在不同剂量下对各种 K^+ 通道有不同的作用, 如对血管平滑肌细胞, Ba^{2+} $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可显著阻断 K_V 和 K_{ATP} 通道, TEA $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 显著阻断 K_V , K_{Ca} 和 K_{ATP} 通道^[6]。本文结果表明大黄素, Gly, Ba^{2+} 和 TEA 均可使细胞膜 RP 升高, 大黄素和 Gly 同时使 POP 缩短, SPF 增加, 增强标本的分节律收缩指标。而 TEA $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Ba^{2+} $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 则使标本分节律收缩消失, 变为强直收缩状态。大黄素, Gly, TEA 和 Ba^{2+} 对 C_{ro} 抑制电和收缩活动的药物作用各有不同的影响。大黄素与 Gly 使 RP 由超极化恢复正常或稍微超极化状态, 其他指标也随之恢复正常, 而 TEA $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 Ba^{2+} $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 则使 RP 由超极化变为显著的持续去极化状态, 导致标本由舒张转变为强直收缩。以上对比表明, 大黄素提高细胞电和收缩兴奋性的作用及对 C_{ro} 药物作用的影响均与 Gly 相似, 而与 TEA, Ba^{2+} 有明显区别。提示大黄素对 K_{ATP} 通道活性起抑制作用。

大黄素与典型 K_{ATP} 通道阻断剂 Gly 的作用程度有所不同, 在相同剂量条件下, 对于正常状态标本, 大黄素的作用较 Gly 强, 而对 C_{ro} 药

物作用的影响, 则 Gly 的作用强于大黄素, 提示大黄素的药物作用可能有更复杂的机制。

参 考 文 献

- 1 Price JM, Patituai P, Fung YC. Mechanical properties of taenia coli smooth muscle in spontaneous contraction. *Am J Physiol*, 1977, **233**:47
- 2 周孜. 单味大黄在消化系统疾病中的应用及作用原理. 中国中药杂志, 1989, **14**:501
- 3 杨文修, 于海鹰, 许文胜, 等. 大黄素对豚鼠结肠带平滑肌细胞电和收缩性能的影响. 生物物理学报, 1994, **10**:82
- 4 杨文修, 于海鹰, 许文胜, 等. 大黄素对肠道平滑肌细胞作用的离子机制. 基础医学与临床, 1995, **5**:67
- 5 Edwards G, Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1993, **33**:597
- 6 Nelson MT, Quayle JM. The physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 1995, **268**:799
- 7 Quasthof S, Spuler A, Spittelmeister W, et al. K^+ channel openers suppress myotonic activity of human skeletal muscle *in vitro*. *Eur J Pharmacol*, 1990, **186**:125
- 8 金正根, 杨文修, 王宁韬, 等. 肠道平滑肌细胞电活动测量技术及药物作用. 南开大学学报, 1992, **1**:70
- 9 Barajas-Lopez C, Hertog AD, Huizinga JD. Ionic basis of pacemaker generation in dog colonic smooth muscle. *J Physiol*, 1989, **416**:385
- 10 Post JM, Hume JR. Ionic basis for spontaneous depolarizations in isolated smooth muscle cells of canine colon. *Am J Physiol*, 1992, **263**:691

EFFECTS OF EMODIN ON THE ACTIVITY OF K CHANNEL IN GUINEA PIG TAENIA COLI SMOOTH MUSCLE CELLS

Li Junying(Li JY), Yang Wenxiu(Yang WX), Hu Wenwei(Hu WW), Wang Jin(Wang J),
Jin Zhenggen(Jin ZG), Wang Xinyu(Wang XY) and Xu Wensheng(Xu WS)

(*Division of Biophysics, Department of Physics, Nankai University, Tianjin 300071*)

ABSTRACT The effects of emodin, cromakalim(K_{ATP} channel opener) glybenclamide(K_{ATP} channel inhibitor) Ba^{2+} and TEA on the electrical and contractive activities of the smooth muscle cells in guinea pig taenia coli and the relationship between emodin and four other drugs were studied by using intracellular microelectrode technique and the tension measuring technique. The results are as follows: (1) Emodin enhances the electrical and contractive activities of the smooth muscle cells in guinea pig taenia coli. The effects of emodin depend on its concentration. (2) Emodin can resist the inhibition of cromakalim on the electrical and contractive activities of smooth muscle cells. On the other hand, cromakalim was shown to suppress the effects of emodin. (3) Ba^{2+} , TEA and glybenclamide all can improve the electrical and contractive activities of smooth muscle cells and resist the inhibition of cromakalim. The effects of emodin were found to be similar to that of glybenclamide but different from that of Ba^{2+} and TEA. The results suggest that the mechanism of action of emodin is to inhibit the activity of K_{ATP} channel in the guinea pig taenia coli smooth muscle cells.

KEY WORDS Emodin; Guinea pig taenia coli; Smooth muscle cell; K channel inhibitor; K_{ATP} channel opener